

1-1-2018

Análisis de heteromorfismos genéticos de *Aedes aegypti* en dos zonas endémicas de dengue en Colombia

Melissa Daniela Valencia Ibatá

Follow this and additional works at: <https://ciencia.lasalle.edu.co/biologia>

Citación recomendada

Valencia Ibatá, M. D. (2018). Análisis de heteromorfismos genéticos de *Aedes aegypti* en dos zonas endémicas de dengue en Colombia. Retrieved from <https://ciencia.lasalle.edu.co/biologia/44>

This Trabajo de grado - Pregrado is brought to you for free and open access by the Departamento de Ciencias Básicas at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Biología by an authorized administrator of Ciencia Unisalle. For more information, please contact ciencia@lasalle.edu.co.

**ANÁLISIS DE HETEROMORFISMOS GENÉTICOS DE *Aedes aegypti*
EN DOS ZONAS ENDÉMICAS DE DENGUE EN COLOMBIA**

Melissa Daniela Valencia Ibatá

UNIVERSIDAD DE LA SALLE
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
BOGOTÁ D.C.
2019

**ANÁLISIS DE HETEROMORFISMOS GENÉTICOS DE *Aedes aegypti*
EN DOS ZONAS ENDÉMICAS DE DENGUE EN COLOMBIA**

Melissa Daniela Valencia Ibatá

Trabajo de grado para obtener
el título de bióloga

Director:

Jesús Eduardo Escobar Castro MSc. PhD.

UNIVERSIDAD DE LA SALLE
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
BIOLOGÍA
BOGOTÁ D.C.
2019

DEDICATORIA

Esta tesis la dedico a DIOS porque gracias a Él este proyecto ha sido posible.

A mi mamá PIEDAD, por ser incondicional en mi vida, por haber dedicado toda su vida a cuidarme, a enseñarme a ser mejor persona cada día y ser todo mi apoyo.

A mis tías CLAUDIA, MERCEDES y AMANDA, quienes siempre han estado con mi mamá, siendo fundamentales en mi formación personal y por todo ese soporte que me han brindado en los momentos más importantes de mi vida.

A mi tío ALVARO, por ser mi papá y un ejemplo a seguir, así mismo, a su esposa LILIA y sus queridos Padres don ALFREDO y doña LILIA.

A mis primos FABIAN, CRISTIAN, JUAN MANUEL y LINA MARÍA, por ser mis hermanos y por todo lo que me han enseñado, siendo una inspiración para ser una mejor persona.

A toda mi familia, TIOS, PRIMOS y PRIMAS, MARÍA DELIA y MAUREEN por todo su apoyo.

A las personas que ya no están conmigo, mi TÍA MARY y mis ABUELOS, que desde el cielo me cuidan y siempre están en mi mente y corazón.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor JESUS ESCOBAR MSc. PhD, que me ha brindado toda su colaboración, apoyo y enseñanzas en el desarrollo del trabajo.

Agradezco a la Universidad de LA SALLE por ser mi ALMA MATER, por la excelente formación brindada durante mis estudios y por su apoyo para el desarrollo de este proyecto a través de la financiación por medio la convocatoria interna VRIT para el fortalecimiento de la investigación.

Secretaria de Salud Departamental de Yopal y Secretaria de Salud Municipal de Sasaima, por la colaboración para la colecta del material biológico.

A todos los profesores que hicieron parte de mi formación profesional, por sus enseñanzas, tiempo y dedicación.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	10
2. OBJETIVOS.....	14
3. METODOLOGÍA	15
3.1 Zona de estudio	15
3.2 Colecta de especímenes.....	16
3.3 Extracción y amplificación del ADN.....	16
3.4 Secuenciación y análisis de secuencias.....	16
3.5 Análisis de variabilidad genética.....	17
3.6 Análisis filogenético.....	17
4. RESULTADOS.....	18
4.1 Secuencias amplificadas	18
4.2 Variabilidad genética.....	19
4.3 Análisis filogenéticos.....	22
5. DISCUSIÓN.....	25
6. CONCLUSIONES	28
7. ANEXOS.....	29
8. BIBLIOGRAFÍA.....	31

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Mapa de ubicación geográfica de las zonas de estudio, Sasaima (Cundinamarca) y Yopal (Casanare). Melissa Valencia (2018). Mapa creado en Qgis
<https://www.qgis.org/es/site/> 15
- Figura 2: Electroforesis productos amplificados del gen COI *Aedes aegypti*, gel de agarosa al 2% 18
- Figura 3: Histograma de distancia genética para *Aedes aegypti*, obtenido por el algoritmo ABGD 20
- Figura 4: Red haplotípica de las secuencias del gen COI de *Aedes aegypti*, poblaciones de Sasaima y Yopal, las líneas intermedias representan el número de mutaciones, el punto rojo representa un vector medio. 21
- Figura 5: Árbol filogenético por el método de máxima verosimilitud (MP) del gen COI de *Aedes aegypti*, poblaciones de Sasaima y Yopal 22
- Figura 6: Árbol filogenético por el método máxima parsimonia del gen COI de *Aedes aegypti*, poblaciones de Sasaima y Yopal. 22
- Figura 7: Árbol filogenético por el método Neighbor-Joining del gen COI de *Aedes aegypti*, poblaciones Sasaima y Yopal. 24

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Resumen de datos de variabilidad genética del gen COI de <i>Aedes aegypti</i> en las poblaciones de Sasaima y Yopal realizados de DNAsp	19
Tabla 2 División de Clúster realizado por el algoritmo ABGD	21

RESUMEN

Aedes aegypti es un mosquito de gran importancia epidemiológica, por ser principal vector del virus del dengue, siendo este uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial, aunque el 40% de la población se encuentra en riesgo de contraer la enfermedad, no se ha desarrollado una vacuna efectiva para la prevención del virus, ni se han elaborado medicamentos específicos para el tratamiento del mismo, por lo que actualmente la mejor estrategia para controlar la enfermedad es a través del control del vector. En virtud de lo anterior, es de vital importancia conocer en profundidad aspectos de bionomía, biología, ecología y genética del mosquito. En Colombia, a pesar de que *Ae. aegypti* se puede hallar en todos los departamentos, son muy pocos los estudios realizados sobre la estructura genético-poblacional de este vector, asumiendo que es una misma especie la que se encuentra en todo el territorio nacional. Evidencias en otros países y algunos en Colombia, muestran variabilidad genética interpoblacional. Por lo anterior este estudio tiene como objetivo, determinar y analizar heteromorfismos genéticos de dos poblaciones colombianas de *Aedes aegypti*, utilizando el marcador molecular Citocromo Oxidasa I (COI). La variabilidad genética se determinó amplificando y secuenciando un fragmento de 709 pb de región barcoding del gen mitocondrial COI (Citocromo Oxidasa I). Se estimaron los parámetros de diversidad haplotípica, variabilidad genética y flujo de genes; y se generaron tres árboles filogenéticos por los métodos Neighbor-Joining (NJ), Máxima Parsimonia (MP), y Máxima Verosimilitud (MV). Se obtuvieron y analizaron 45 secuencias del gen COI de *Aedes aegypti*, con longitud de 709 pb con primers y 658 pb sin primers, de las cuales se hallaron 12 haplotipos y una diversidad haplotípica de 0.4333, también se evidencio flujo de genes, ya que todos los estadísticos Nm fueron mayores a 1. Fue posible identificar *Ae. aegypti* con el gen COI, hallando variabilidad genética en este marcador y la existencia de flujo genético entre las poblaciones.

ABSTRACT

Aedes aegypti is a mosquito of great epidemiological importance, as it is the main vector of the dengue virus, being this one of the main public health problems worldwide, although 40% of the population is at risk of contracting the disease, not an effective vaccine for the prevention of the virus has been developed, nor have specific drugs been developed for the treatment of it, so that currently the best strategy to control the disease is through the control of the vector. In view of the above, it is of vital importance to know in depth aspects of bionomics, biology, ecology and genetics of the mosquito. In Colombia, despite the fact that *Ae. aegypti* can be found in all departments, there are very few studies on the genetic-population structure of this vector, assuming that it is the same species that is found throughout the national territory. Evidence in other countries and some in Colombia, show interpopulation genetic variability. Therefore, this study aims to determine and analyze genetic heteromorphisms of two Colombian populations of *Aedes aegypti*, using the molecular marker Cytochrome Oxidase I (COI). The genetic variability was determined by amplifying and sequencing a 710 bp fragment of the barcoding region of the mitochondrial gene COI (Cytochrome Oxidase I). The parameters of haplotypic diversity, genetic variability and gene flow were estimated; and three phylogenetic trees were generated by the Neighbor-Joining (NJ), Maximum Parsimony (MP), and Maximum Likelihood (ML) methods. We obtained and analyzed 45 sequences of the COI gene of *Aedes aegypti*, with a length of 709 bp with primers and 658 bp without primers, of which 12 haplotypes were found and a haplotype diversity of 0.4333, gene flow was also evident, since all the Nm statistics were greater than 1. It was possible to identify *Ae. aegypti* with the COI gene, finding genetic variability and the existence of genetic flow among the populations.

1. INTRODUCCIÓN

Aedes aegypti (Linnaeus, 1762) es un mosquito de gran importancia epidemiológica, por ser el principal vector de los virus del zika, chikunguña, fiebre amarilla y de los cuatro serotipos de Dengue (DENV 1-4), siendo este último uno de los principales problemas de salud pública en el mundo, especialmente en los países tropicales (1) (2). *Ae. aegypti* es un mosquito holometábolo, de hábitos antropofílicos y domésticos, distribuido a nivel mundial especialmente en regiones tropicales y subtropicales (3).

Ae. aegypti es originario de las selvas del África y se cree que migró a América durante los siglos XV al XVII, a través de los barcos que se usaban para el comercio de mercancía o para el transporte de esclavos (4). En Colombia su presencia se ha reportado en todos los departamentos del país con una altitud hasta los 2300 msnm (5).

Este mosquito pertenece a la familia Culicidae, a la tribu Culicini, al género *Aedes* y al subgénero *Stegomyia* (6). Se caracteriza por vivir cerca al ser humano, ya sea dentro de los domicilios o en sus alrededores, los principales sitios de cría son los depósitos de agua limpia, asociados al uso humano (7). En relación con su alimentación, exclusivamente las hembras son hematófagas, teniendo en la sangre una fuente de proteína necesaria para el desarrollo de sus huevos, mientras que los machos se alimentan de néctar y jugo de las frutas (8).

Durante su desarrollo ontogénico pasan por los estadios de huevo, cuatro fases larvales, pupa y por último emerge el adulto. Los huevos son colocados por la hembra de manera individual, por encima del nivel del agua en las paredes del recipiente o estanque, a partir de esto el huevo completa su desarrollo embrionario en 48 horas si se presentan las condiciones de temperatura y humedad relativa óptimas (8). Seguidamente se presenta la fase de larva, que como se había mencionado consta de cuatro estadios exclusivamente acuáticos, en donde la larva se alimenta de material orgánico sumergido o acumulado en las paredes del recipiente o estanque, se mantienen en el agua de manera casi vertical y nadan con un movimiento serpenteante. La larva tiene cabeza, tórax y abdomen y completan su desarrollo entre cinco y siete días dependiendo la temperatura (8) (9).

Superada la fase larval, continua el estadio denominado pupa que dura entre uno y dos días, continuando sumergidos en el agua, en donde no se alimentan y se presentan modificaciones anatómicas y fisiológicas hasta que emergen los adultos (8). El adulto es un mosquito oscuro con bandas blancas en las bases de los segmentos tarsales, con un tamaño aproximado de 5mm de largo. En esta fase el macho se distingue de la hembra por sus antenas plumosas y palpos más largos (10).

El virus del dengue se encuentra categorizado como un arbovirus (virus transmitido por vectores artrópodos) perteneciente a la familia Flaviviridae, del género *Flavivirus* que posee cuatro serotipos (DENV 1-4), su genoma viral está constituido por una hebra sencilla de ácido ribonucleico (ARN). El dengue es actualmente la enfermedad arboviral más común en los seres humanos (7), se caracteriza por tener un periodo de incubación de siete a diez días, donde puede producir una amplia gama de síntomas clínicos que van desde la fiebre hasta hemorragias que pueden ser fatales (dengue hemorrágico). Entre los síntomas que se pueden presentar se encuentran fiebre elevada, erupciones en la piel, dolores musculares (mialgias), dolores articulares (artralgias), náuseas, vómitos, alteraciones gastrointestinales, cefalea, diarrea o síndrome hemorrágico (11) (8).

Alrededor del mundo, anualmente se producen aproximadamente 390 millones de infecciones de dengue, y alrededor del 40% de la población está en riesgo de infección (11) (12). Debido a la falta de vacunas efectivas para el control del virus y a la carencia de medicamentos específicos para tratar el mismo, la mejor estrategia para prevenir la infección es a través del control del vector (13) (14) (15). Según el Instituto Nacional de Salud, en Colombia, hasta julio de 2018 se presentaron 14563 casos de dengue, de los cuales el 52.3% corresponde a dengue sin signos de alarmas, el 46, 3% a dengue con signos de alarma y el 1.3% a dengue grave (16).

Siendo Colombia un país hiperendémico para el dengue, y a pesar de su importancia epidemiológica en la salud pública (13), aún no es conocida totalmente la estructura genético – poblacional de su vector, el mosquito *Ae. aegypti*. Adicionalmente, en la actualidad se asume que es una misma especie de mosquito la que circula en todo el territorio colombiano, pese a que se ha evidenciado polimorfismos interpoblacionales con algunos marcadores en estudios realizados en el noroccidente y sur del país (13) (15) (17) (18). Incluso varios

estudios realizados en Brasil (2) (17) (19), Argentina (20) y Perú (21), también han encontrado evidencias de variabilidad genética entre poblaciones de la especie. Estas variaciones genéticas pueden eventualmente manifestarse como variaciones en el comportamiento de picadura, nivel de antropofilia, capacidad y competencia vectorial, resistencia a insecticidas y otros aspectos relevantes en la transmisión de patógenos, lo que puede conllevar a cambios en la morbilidad y mortalidad de las enfermedades transmitidas.

Una de las herramientas moleculares para identificar la variabilidad genética, es el ADN mitocondrial (ADNmt), el cual se utiliza ampliamente como marcador genético en poblaciones y en biología evolutiva. El polimorfismo del ADN mitocondrial es una herramienta ampliamente utilizada para evaluar el flujo genético de las especies y se ha usado en estudios genéticos de poblaciones de *Ae. aegypti* de diferentes regiones geográficas especialmente donde el virus del dengue es endémico (19).

Citocromo Oxidasa es una enzima mitocondrial que conduce a la formación de ATP. La enzima está formada por 13 subunidades, 3 de las cuales se encuentran codificadas en el ADN de la mitocondria, estas subunidades son: Citocromo oxidasa I (COI), Citocromo oxidasa II (COII) y Citocromo oxidasa III (COIII). El gen que codifica la subunidad COI es un gen altamente conservado, pero tiene regiones de alta tasa de sustitución, lo que se manifiesta en alta variación de la secuencia entre especies del mismo género (22).

Este estudio determinó los heteromorfismos genéticos con la finalidad de hallar diferencias del gen COI, entre dos poblaciones que se encuentran en zonas endémicas de dengue, separadas por la cordillera oriental, como lo son la ciudad de Yopal y el municipio de Sasaima. De este modo se espera aportar conocimiento básico de *Ae. aegypti* que puede contribuir a explicar la estructura genético poblacional del mosquito en zonas donde la transmisión del dengue es endémica, información necesaria para comprender la dinámica poblacional, la epidemiología de la enfermedad y la distribución del vector en las regiones, aportando información sobre la biología, genética, ecología, comportamiento y bionomía del vector para proponer controles del mosquito. En particular, con las variaciones genotípicas dado su carácter heredable, plasticidad y modulación ambiental, para así determinar efectos ambientales en las poblaciones, procesos de especiación, evolución de resistencia a insecticidas, adaptación y dispersión (18).

En los resultados se determinó variabilidad genética entre los individuos de *Ae. aegypti* con el marcador COI, ya que se obtuvieron 12 haplotipos y fueron diferentes los estadísticos de variabilidad genética como la diversidad nucleotídica y haplotípica. No obstante, esta variabilidad no fue suficiente para diferenciar las poblaciones, lo que fue confirmado con un flujo génico moderado. Además, se evidenciando que la población de Sasaima es la que presento mayor variabilidad genética.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar y analizar heteromorfismos genéticos de dos poblaciones colombianas de *Aedes aegypti*, utilizando el marcador molecular Citocromo Oxidasa I (COI).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Generar información del marcador molecular COI de dos poblaciones colombianas de *Ae. aegypti*.
- Determinar las diferencias genéticas entre las dos poblaciones de *Ae. aegypti*.
- Calcular estimativos de estructura genética y flujo de genes.
- Comparar la estructura y el flujo genético entre las dos poblaciones de *Ae. aegypti*.

3. METODOLOGÍA

3.1 Zona de estudio

Las zonas de estudio seleccionadas para el desarrollo de este proyecto fueron;

1. La ciudad de Yopal (Casanare), la cual se encuentra ubicada en el piedemonte de la Cordillera Oriental (05°20'16''N y 72°23'45''W), a una altura de 350 msnm, con temperatura promedio de 26° C (23).
2. El municipio de Sasaima (Cundinamarca) ubicado a 04° 58' 53'' N y 74° 26' 13'' W, a una latitud de 1194 msnm y con una temperatura promedio de 22°C (24).

Estas dos zonas están separadas por la cordillera Oriental, a una distancia aproximada de 230 Km como se puede observar en le figura 1. Según el SIVIGILA en estas dos zonas se han presentado casos de Dengue, Chikunguya y Zika y son dos regiones con transmisión de dengue endémico (8).

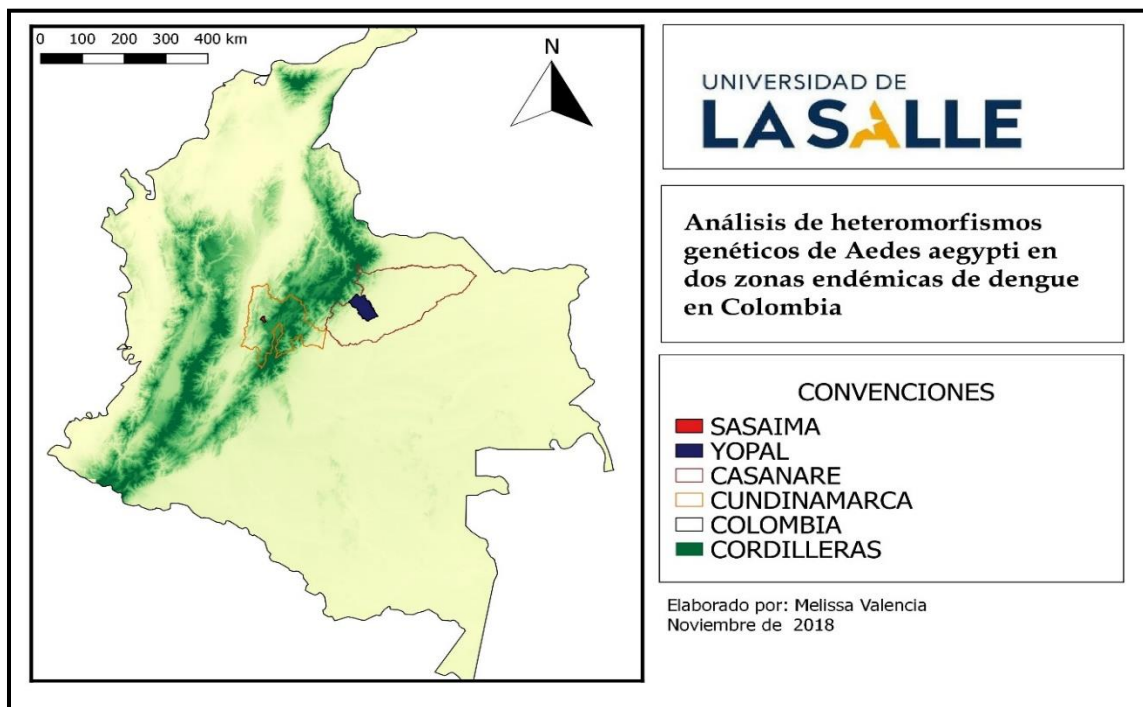


Figura 1: Mapa de ubicación geográfica de las zonas de estudio, Sasaima (Cundinamarca) y Yopal (Casanare). Melissa Valencia (2018). Mapa creado en Qgis <https://www.qgis.org/es/site/>

3.2 Colecta de especímenes.

Para la recolección de especímenes, se utilizaron metodologías como el atrayente humano protegido, trampas de luz, búsqueda en reposo y captura en estadios inmaduros. Cabe mencionar que las hembras capturadas se individualizaron en viales de 0,5 ml, depositándolas en bolsas plásticas con sílica gel. Para los especímenes en estadios inmaduros, se realizó la búsqueda en criaderos como: llantas, jarrones canaletas o cualquier recipiente que permitía el almacenamiento de agua, las larvas fueron transportadas al laboratorio en recipientes sellados y allí se criaron hasta completar el estado adulto, los cuales se individualizaron y se colocaron en un freezer a -25°C. La identificación de los especímenes se realizó con las claves taxonómicas dicotómicas para *Aedes* (25) (26).

3.3 Extracción y amplificación del ADN.

El ADN genómico de los especímenes recolectados se extrajo a partir del abdomen de los mosquitos adultos, utilizando el Kit Dneasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Germantown, MD, USA). Durante el desarrollo de esta actividad se procesaron 60 muestras, correspondientes a 30 mosquitos para cada sitio de estudio. El fragmento de 709 pb de la región barcoding del gen mitocondrial COI (Citocromo Oxidasa I) se amplificó usando los primers diseñados por Folmer, Black, Hoeh & Vrijenhoek (27) y aplicando las siguientes condiciones para el PCR, 1x de Buffer, 0.42mM de dNTPs, 2mM de MgCl₂ 0.2 U de Taq Polimerasa, 0.3 μM de cada Primer y 2μL de ADN (28) y utilizando tres controles (positivo, negativo y reactivo). Estos productos amplificados se observaron en geles de agarosa al 2% en presencia de 0,5 mg/ml Gel Red, posteriormente fueron purificados con etanol utilizando el protocolo desarrollado por Green & Sambrook (29).

3.4 Secuenciación y análisis de secuencias.

Para la secuenciación del producto de PCR purificado se utilizaron los servicios de un laboratorio especializado (MacroGen), con una codificación de acuerdo a la población donde se usó S para Sasaima y Y para Yopal. Obteniendo como resultado 26 secuencias de la población de Yopal y 19 secuencias de Sasaima. Las secuencias obtenidas se editaron en Bioedit (30) y se alinearon manualmente en MEGA X (31), para compararlas con las

disponibles en GenBank utilizando la herramienta de alineación de secuencias BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (32) y Boldsystem (33). y los análisis estadísticos de las secuencias se calcularon con MEGA X (31)

3.5 Análisis de variabilidad genética.

Se utilizó el software DnaSP 6 (34) para calcular el número de haplotipos, la frecuencia haplotípica y el número de sitios polimórficos y segregantes (S), la diversidad haplotípica (Hd), la diversidad nucleotídica (π). Se construyó una red haplotípica para determinar distribución de los haplotipos, con el software Network versión 5.0.1.0 con el algoritmo Median Joining (35). Complementario a lo anterior, se aplicó el algoritmo ABGD, (Automatic Barcode Gap Discovery) (36) para la delimitación de especies, con el fin de confirmar, basado en asignación de organismos dentro de especies hipotéticas, los heteromorfismos genéticos obtenidos.

3.6 Análisis filogenético.

Con el fin de verificar la solidez de la formación de clústeres o agrupamiento de las secuencias, y establecer la relación filogenética entre los individuos de las poblaciones analizadas, se construyeron, utilizando el software Mega X (31), árboles filogenéticos, con tres diferentes métodos, a saber: Neighbor-Joining (NJ), Máxima Parsimonia (MP), y Máxima Verosimilitud (MV) (33).

4. RESULTADOS

4.1 Secuencias amplificadas

Se obtuvieron, editaron y analizaron 45 secuencias del gen COI de *Aedes aegypti*, con longitud de 709 pb con primers y 658 pb sin primers. Cada secuencia se comparó con las bases de BoldSystems y Genbank, en donde se pudo verificar que todas corresponden a *Ae. aegypti*, con un porcentaje de similitud entre el 99 y 100% (Anexo 1). En la figura 2, se observa en el gel de agarosa del fragmento de 709 pb correspondiente a la amplificación del gen COI.

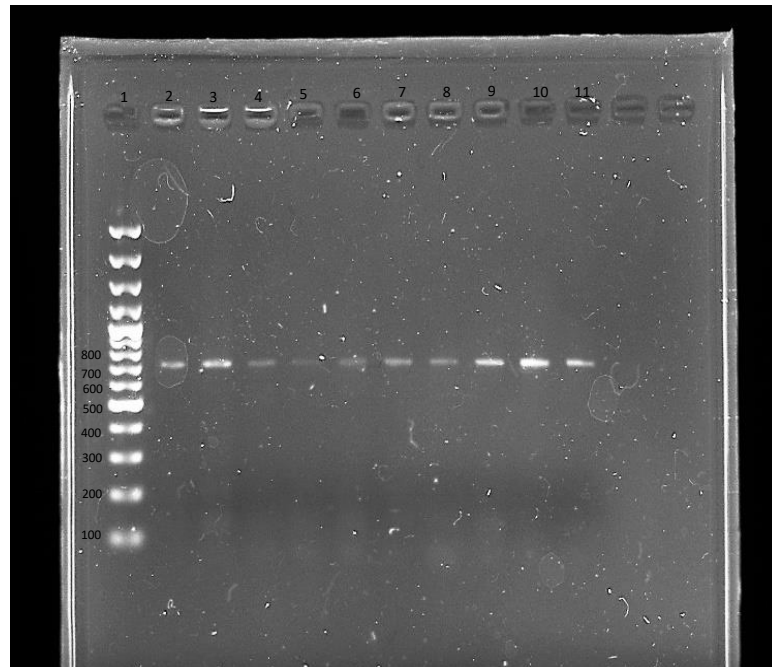


Figura 2: Electroforesis productos amplificados del gen COI *Aedes aegypti*, gel de agarosa al 2%. Carril 1 = Marcador de peso molecular Carriles 2 al 11= Muestra

Además, las secuencias se compararon con el gen Citocromo Oxidasa completo (Acceso GenBank EU352212.1), el cual tiene una longitud de 16,655 nt. Dentro de este gen las secuencias se ubicaron entre los nucleótidos 1,314 a 2,022, tal como se esperaba.

4.2 Variabilidad genética

A partir del análisis de las secuencias, se determinaron 12 haplotipos (Anexo 2). El haplotipo 2 el cual está constituido por 34 secuencias, se encuentra en las dos poblaciones. Las secuencias mostraron una diversidad haplotípica (h_d) de 0.4333 y una diversidad nucleotídica (π) de 0.00507. Se encontraron 23 (3.4%) polimorfismos de los cuales 15 fueron sitios de parsimonia, 8 sitios singleton y 23 sitios segregantes (S). También se determinó la diferencia entre parejas de haplotipos (k) = 3.598. En relación con la variabilidad interpoblacional se halló un promedio de diferencias nucleotídicas de 4.747.

En relación con el flujo génico, para todos los algoritmos utilizados el valor N_m fue siempre >1 , en los estadísticos obtenidos según Nei 1973 el valor de $N_m = 5.76$, Nei 1982 $N_m = 1.95$, Lynch and Crease 1990 $N_m = 1.33$ y Hudson, Slatkin and Maddison 1992 $N_m = 1.34$, y complementario a esto el índice de fijación (F_{st}) obtuvo un valor de 0.27226, lo puede concluir que existe un moderado flujo génico.

En la tabla 1 se observa que la población de Sasaima presentó en todos los indicadores de diversidad genética valores más altos que la población de Yopal. Para el marcador COI, la población de Sasaima tiene más haplotipos una diversidad haplotípica y nucleotídica más alta, así como la diferencia entre parejas de haplotipos. Esta población presenta más sitios polimórficos (20) de los cuales el 75 % son sitios de parsimonia y el 5% son sitios singleton, En la población de Yopal solo se hallaron 3 haplotipos y 3 sitios polimórficos, lo que significa que esta población tiene una menor variabilidad genética que la población de Sasaima.

Tabla 1: Resumen de datos de variabilidad genética del gen COI de *Aedes aegypti* en las poblaciones de Sasaima y Yopal (Software DNAsp)

POBLACIÓN	SASAIMA	YOPAL
Numero de secuencias	19	26
Número de sitios polimórficos	20	3
Sitios segregantes (S)	20	3
Número de haplotipos	10	3
Diversidad haplotípica (H_d)	0,737	0,151
Diversidad nucleotídica (π)	0.00942	0.00033

Sitios singleton	5	3
Sitios parsimonia	15	0
Diferencias entre parejas de haplotipos (k)	6.678	0.231

En la figura 3 se observan los resultados obtenidos por el algoritmo ABGD, (Automatic Barcode Gap Discovery). este algoritmo organizó las secuencias en 5 clúster separados por la distancia genética. Los agrupamientos no corresponden estrictamente a las dos poblaciones en estudio, debido a que, excepto el grupo 2, en cada uno de ellos se encuentran tanto muestras de Yopal como de Sasaima (tabla 2).

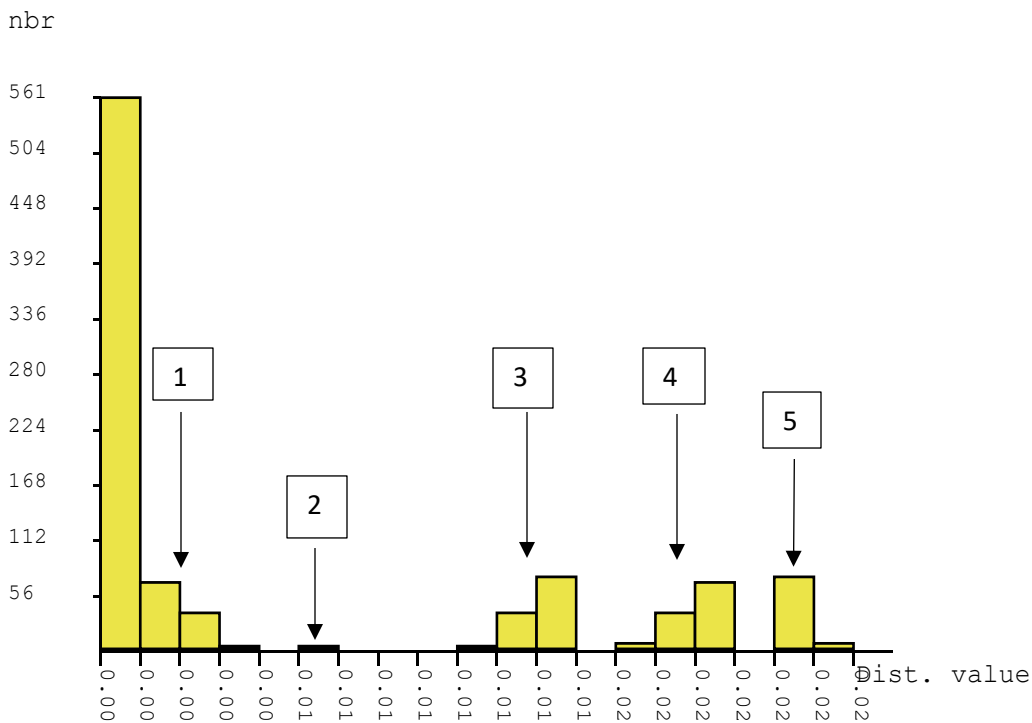


Figura 3: Histograma de distancia genética para *Aedes aegypti*, obtenido por el algoritmo ABGD, eje x distancias genéticas.

Tabla 2 División de Clúster realizado por el algoritmo ABGD, S=Sasaima, Y=Yopal

CLÚSTER	SECUENCIAS	Nº DE SECUENCIAS
1	100S 101Y 103Y 104Y 105Y 107Y 113Y 115Y 117Y 122Y 124Y 125Y 132Y 133Y 356Y 357Y 367Y 370Y 375Y 376Y 382S 384S 394S 398S 400S 401S 403S 451Y 453Y 454Y 455Y 465Y 487S 509S	34
2	142S 157S 165S 19S 392S 402S 406S 510S	8
3	102Y	1
4	372Y	1
5	399S	1

La red haplotípica, que se muestra en la figura 4, representa el número de haplotipos presentados según la frecuencia de las secuencias que lo componen. Como se aprecia en la figura respectiva el haplotipo 2 (H_2), fue el que estuvo constituido por el mayor número de secuencias. La red también nos muestra cómo se relacionan los haplotipos entre sí, lo que nos permite observar que se generan 3 grupos, el primero formado por los haplotipos H_2, 12 (H_12), 4 (H_4), 3 (H_3) y 8 (H_8), siendo H_8 el que presenta mayor distancia por que tiene más cambios es la secuencia de nucleótidos, estando a 8 pasos mutacionales, el segundo grupo lo componen los haplotipos 7 (H_7), 5 (H_5) y 6 (H_6) y el último grupo están los haplotipos 10 (H_10), 11 (H_11), 1 (H_1) y (H_9). También se presenta un vector medio (mv1) (punto rojo), que puede representar una conexión entre las secuencias o una mutación relevante.

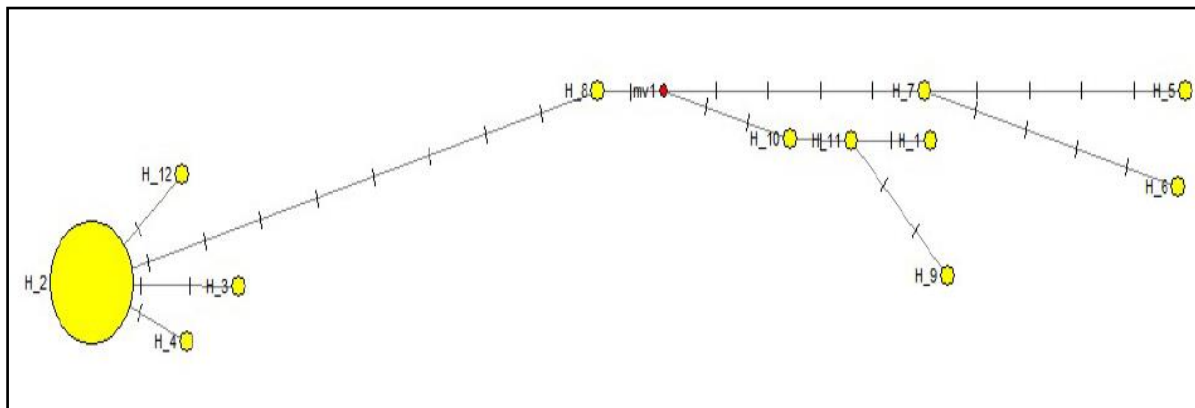


Figura 4: Red haplotípica de las secuencias del gen COI de *Aedes aegypti*, poblaciones de Sasaima y Yopal, las líneas intermedias representan el número de mutaciones, el punto rojo representa un vector medio.

4.3 Análisis filogenéticos

A partir de las secuencias obtenidas se construyeron 3 árboles filogenéticos cada uno por un método diferente. Lo anterior, con el fin de tener una mayor certeza de la topología de los agrupamientos. Una secuencia del gen COI *Aedes albopictus* obtenida de GenBank se utilizó como out group (ACCESSION KX886338). La figura 5 muestra el árbol consenso construido con el método de máxima verisimilitud (MV), en donde la historia evolutiva se dedujo utilizando el método de probabilidad máxima y el modelo Kimura de 2 parámetros, con 2000 réplicas. El segundo método basado en caracteres fue Máxima Parsimonia (MP) (figura 6), en el cual la historia evolutiva se infirió utilizando el método del mismo nombre, obtenido con 2000 réplicas. El tercer método Neighbor-Joining (NJ) (figura 7), basado en las distancias evolutivas, estas se calcularon utilizando el método de Probabilidad Máxima Compuesta, obtenido con 2000 réplicas.

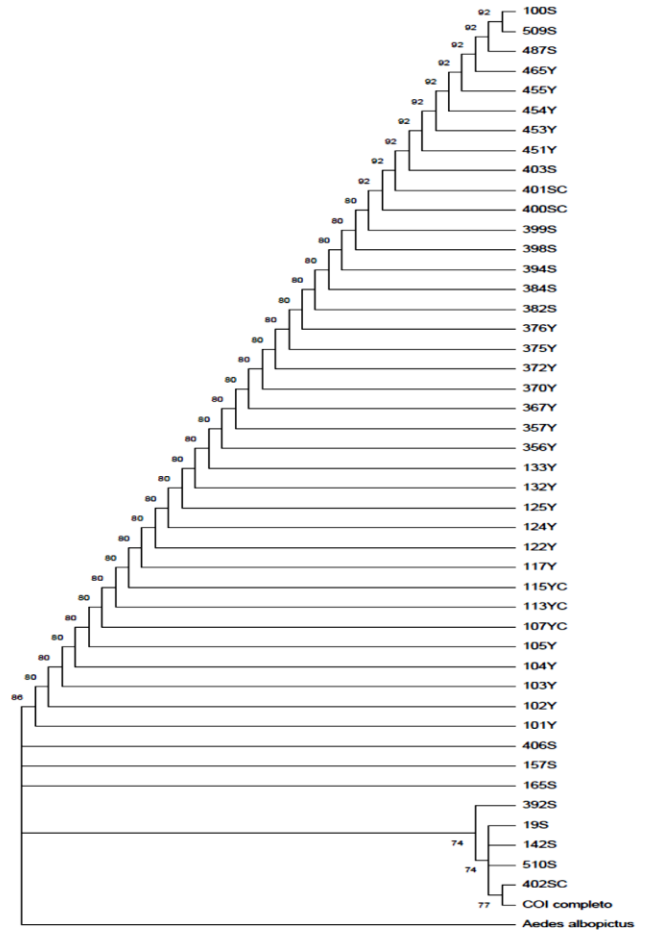
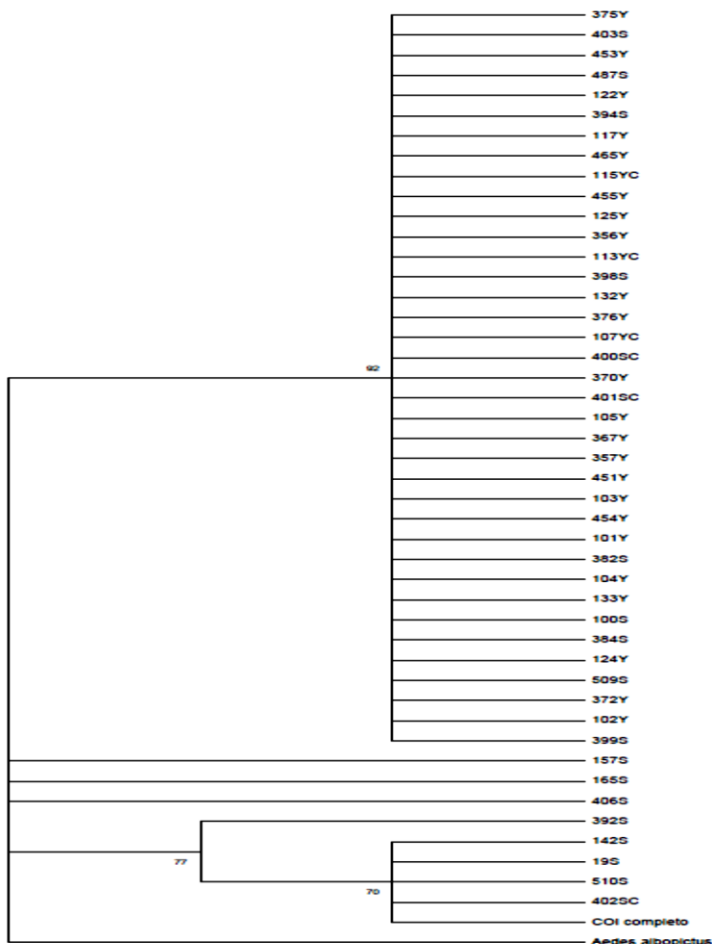


Figura 5: Árbol filogenético por el método de Máxima Verosimilitud del gen COI de *Aedes aegypti*, poblaciones de Sasaima y Yopal

Figura 6:Árbol filogenético por el método Máxima Parsimonia del gen COI de *Aedes aegypti*, poblaciones de Sasaima y Yopal.

En los tres árboles se halló una topología similar, con valores de Bootstrap mayores al 70%. Los árboles muestran dos clados principales, y uno de ellos agrupa la mayoría de las secuencias, incluyendo individuos de las dos poblaciones. No obstante, hay algunas variaciones en relación con clados sin resolver. Mientras que en el árbol de MV (figura 5) y el árbol MP (figura 6) se presentan 3 clados no resueltos, siendo estos de la población de Sasaima. En estos dos árboles también se presenta un segundo clado con 5 secuencias de la población de Sasaima. En cambio, en el árbol de NJ (figura 7) se aprecia que estas tres secuencias se agrupan al segundo clado, donde se observan 7 secuencias de Sasaima y solo un clado no resuelto siendo este la secuencia 19S.

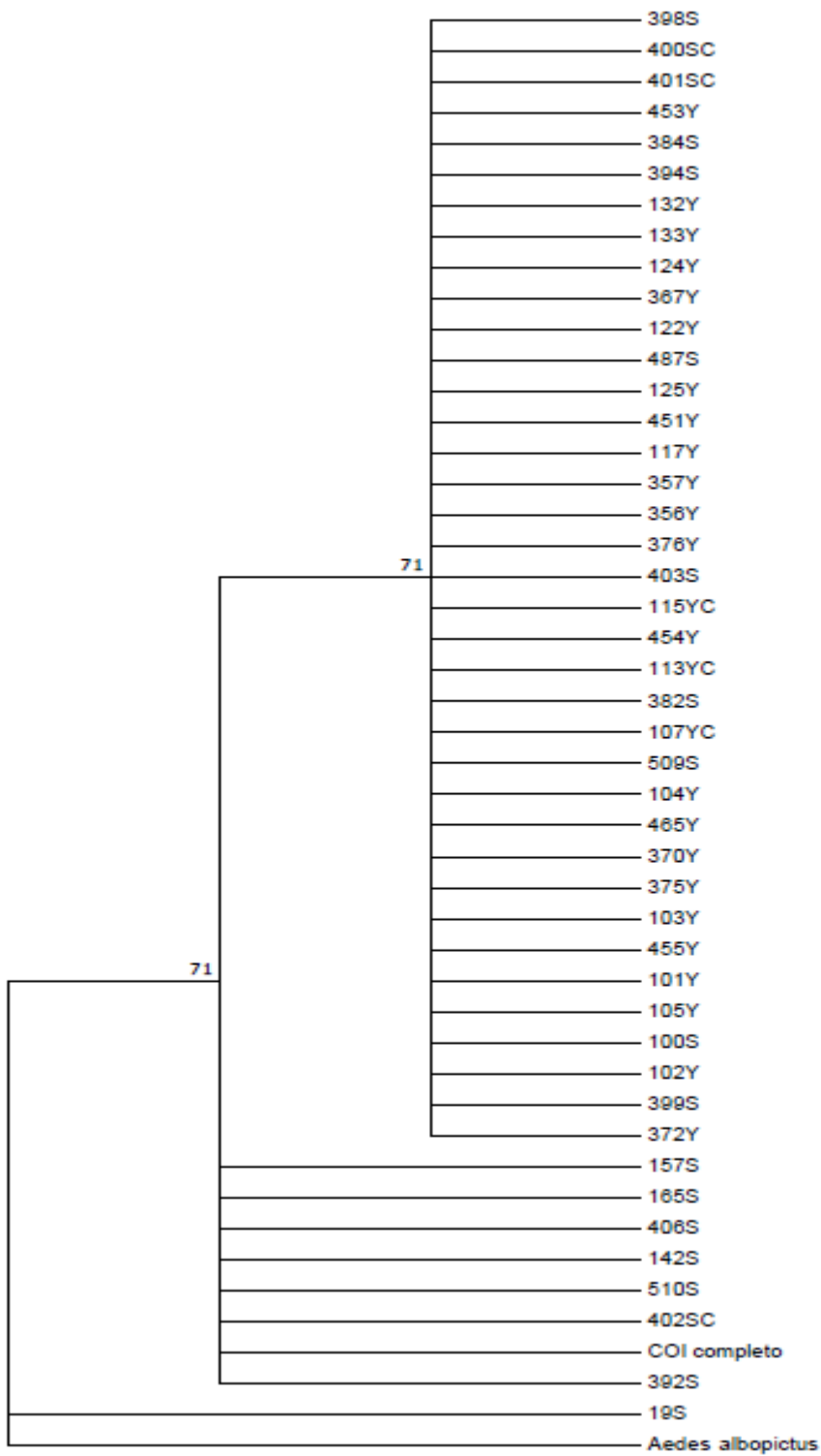


Figura 7: Árbol filogenético por el método Neighbor-Joining del gen COI de *Aedes aegypti*, poblaciones Sasaima y Yopal.

5. DISCUSIÓN

En este estudio fue posible amplificar y analizar secuencias del gen COI de *Ae. aegypti*, a partir de muestras obtenidas en campo en las zonas de estudio. Se estandarizó en el laboratorio de entomología de La Universidad de La Salle, el respectivo protocolo, lo que permitirá, para futuras investigaciones, apoyar la identificación del mosquito a partir de esta metodología. La utilidad de este protocolo como estrategia de apoyo taxonómico, se confirmó dada la alta similitud de las secuencias obtenidas en esta investigación con las reportadas para la especie en las bases de datos como Boldsystem y Genbank.

Los resultados de esta investigación mostraron que existe variabilidad genética del marcador COI en las poblaciones de *Ae aegypti*. Esta variabilidad genética, también ha sido hallada en otros estudios realizados tanto en Colombia como en Suramérica. En un estudio realizado en Brasil con un análisis al gen ND4 obtuvieron una diversidad haplotípica y genética relativamente alta ($h=0.6938$ y $pi 0.01486$), aunque el flujo de genes fue bajo, hallaron diversidad genética entre las poblaciones (2). Al igual que un estudio realizado en departamento de Sucre con el gen ND4 en el cual los autores encontraron gran variabilidad interpoblacional y concluyeron que hay de diferencias genética de *Ae. aegypti* entre los municipios del departamento (37). La variabilidad genotípica y fenotípica en mosquitos se puede explicar bien sea por factores ambientales como temperatura, altura, humedad relativa y las características ecológicas de las zonas donde obtuvieron las muestras, además por factores antropogénicos como el uso indiscriminado de insecticidas para el control del vector (3).

Los resultados muestran que la variabilidad genética mostrada por el marcador COI no es suficiente para separar las poblaciones. No obstante, se generaron resultados importantes que aportan al conocimiento de la estructura genética de *Ae. aegypti* en Colombia. Uno de ellos es la mayor variabilidad genética que presentó la población de Sasaima, en relación con la población de Yopal. Las muestras de Sasaima mostraron mayor cantidad de haplotipos, más diversidad nucleotídica y haplotípica, mayor cantidad de sitios polimórficos y segregantes, entre otros estimativos de variabilidad genética. Otro aspecto importante es la determinación de una posible subpoblación en la localidad de Sasaima.

Por otra parte, los indicadores genético-poblacionales mostraron que existe un importante flujo génico interpoblacional, situación que posiblemente no ha permitido la diferenciación genética local dada por la acción de la deriva genética, y otras fuerzas evolutivas.

Esta es una situación de particular interés dado que las poblaciones en estudio están separadas por la Cordillera Oriental y aproximadamente a 230 km de distancia. En ese sentido, es muy probable que ese flujo génico sea modulado por la actividad humana, ya que el mosquito no utiliza su vuelo para recorrer largas distancias y la hembra no presenta un vuelo tan extenso durante su vida (38), sino que presenta una migración pasiva o forzada por el ser humano, ya sea por sus actividades comerciales o sistemas de transporte que se usan (3) (39), lo que explicaría que la barrera geográfica natural antes mencionada no ha sido suficiente para aislar las poblaciones, aunque sean dos zonas con condiciones geo ambientales diferentes.

Los estimativos de variabilidad y flujo génico se corroboraron con árboles filogenéticos, en donde también se detecta que la variabilidad genética no es tan alta como para aislar o separar las poblaciones. Por ejemplo, en uno de los clados se observan secuencias tanto de Yopal como de Sasaima. De igual forma con el algoritmo ABGD, se obtuvieron 5 clúster donde no es posible separar por población.

Algunos estudios muestran que en Colombia se puede dar una mayor variabilidad genética entre individuos que en otros países de Suramérica, dada posiblemente por las condiciones geográficas propias del país, las medidas de control químico y las facilidades o dificultades de transporte local, entre otras. En un estudio realizado en Antioquía (Colombia) (18) con una muestra de 255 individuos, encontraron 33 haplotipos, al igual que un estudio realizado en la Riohacha (Guajira), Bello (Antioquia) y Villavicencio (Meta) en el cual hallaron entre gen COI y el gen ND4, 161 haplotipos (13). Esta cantidad de haplotipos es mayor que los encontrados en otros estudios de Suramérica como Brasil en el cual determinaron 7 y 10 haplotipos (40) (41) y en Bolivia donde encontraron 8 haplotipos, donde los autores explican que la baja diversidad en esa zona era por el aislamiento geográfico de Bolivia y por el poco acceso terrestre que se tiene con otras zonas del continente (38).

En Colombia se consideró *Ae. aegypti* erradicada entre 1952 y 1960 como resultado del programa de erradicación organizado por la Organización Panamericana de la Salud. Infortunadamente este programa se suspendió en 1960, produciendo una reinvasión del

vector en todo el país (13). Según la red haplotípica y teniendo en cuenta la alta frecuencia del haplotipo 2 (presente en las dos poblaciones), es posible inferir que este haplotipo sea uno de primeros haplotipos introducido aquí en Colombia, ya que según la base de datos Boldsystem (33) este haplotipo también se ha reportado en otras zonas del país y en otros países de América (36). Lo anterior sugiere que este haplotipo halla persistido desde la trata de esclavos (18).

La población de Yopal mostró significativamente menor variabilidad genética que la población de Sasaima (Figuras 5 -7), (Tabla 1), En Yopal, solo se presentaron 3 haplotipos a diferencia de Sasaima en la cual se determinaron 10 haplotipos. La razón de lo anterior, puede deberse, parcialmente al uso indiscriminado de insecticidas (42), Está comprobado, que en muchos casos, pueden sobrevivir pequeños grupos poblacionales de mosquitos, después de una fumigación indiscriminada. Lo que pasa realmente con estas poblaciones es difícil de establecer, ya que sobre ellos las fuerzas evolutivas pueden tener diferentes efectos. No obstante, hay evidencia que los efectos de la deriva génica en poblaciones pequeñas es mucho mayor que en poblaciones grandes, lo cual puede potenciar la variabilidad genética y la eventual formación de subpoblaciones, sub especies y especies (13).

En relación con la población de Sasaima, los árboles muestran que hay un clado que está constituido sólo por secuencias de esa población, y es confirmado por el algoritmo ABGD, en el cual también se presentó un clúster únicamente con individuos de Sasaima. Lo anterior, indicaría que aparentemente se puede estar formando una incipiente subpoblación, es esta localidad. Tal como se mencionó anteriormente, efectos cuello de botella pueden darse, porque durante los brotes de dengue, las poblaciones son sometidas a insecticidas causando una alta mortalidad en la población, pero se puede presentar una recolonización por poblaciones que son menos tratadas (43). Es posible que esta subpoblación reaccione diferente a las medidas de control generalizadas y pueda generar cambios presencia, morbilidad y mortalidad de enfermedades como Dengue, Chikunguña, Zika y Fiebre amarilla. Dado que es conocido que la estructura genética de los mosquitos puede influir en su capacidad de transmitir patógenos, y en otros aspectos de su biología y bionomía que tienen importancia epidemiológica, como son los niveles de antropofilia, comportamiento de picadura, resistencia a insecticidas, capacidad y competencia vectorial (18).

6. CONCLUSIONES

1. Los heteromorfismos determinados fueron hallados en ambas poblaciones de *Ae. aegypti* en las áreas de estudio.
2. El marcador molecular COI fue útil para identificar *Ae. aegypti*.
3. Las poblaciones de *Ae. aegypti* estudiadas mostraron variabilidad genética
4. Entre las dos poblaciones en estudio existe flujo génico.
5. La población de Sasaima mostró la mayor variabilidad según los indicativos de variabilidad obtenidos.
6. La población de Sasaima mostró dos linajes, lo que podría ser indicios de formación de una incipiente subpoblación.

RECOMENDACIONES

Se recomiendan más estudios sobre la estructura genético-poblacional en las zonas, utilizando otros marcadores moleculares y asociar a distintas metodologías como lo son la morfología, la ecología, entre otras.

7. ANEXOS

Anexo 1. Tabla comparativa secuencias con bases de datos BoldSystem y Genbank

SECUENCIA	BOLDSYSTEM		GENBANK BLAST		ESPECIE
	Similitud (%)	Código	Similitud (%)	Código	
402	100	BOLD:AAA4210	100	KX420476.1	<i>Aedes aegypti</i>
107	100	BOLD:AAA4210	100	KX420439.1	<i>Aedes aegypti</i>
113	100	BOLD:AAA4210	100	KX420439.1	<i>Aedes aegypti</i>
115	100	BOLD:AAA4210	100	KX420439.1	<i>Aedes aegypti</i>
400	100	BOLD:AAA4210	100	KX420439.1	<i>Aedes aegypti</i>
401	100	BOLD:AAA4210	100	KX420439.1	<i>Aedes aegypti</i>
100	100	BOLD:AAA4210	100	KX420439.1	<i>Aedes aegypti</i>
384	100	BOLD:AAA4210	100	KX420439.1	<i>Aedes aegypti</i>
102	100	BOLD:AAA4210	99	KX420439.1	<i>Aedes aegypti</i>
103	100	BOLD:AAA4210	100	KX420439.1	<i>Aedes aegypti</i>
104	100	BOLD:AAA4210	100	KX420439.1	<i>Aedes aegypti</i>
398	100	BOLD:AAA4210	100	KX420439.1	<i>Aedes aegypti</i>
399	99,85	BOLD:AAA4210	99	KX420439.1	<i>Aedes aegypti</i>
403	100	BOLD:AAA4210	100	KX420439.1	<i>Aedes aegypti</i>
406	100	BOLD:AAA4210	99	KM457525.1	<i>Aedes aegypti</i>
382	100	BOLD:AAA4210	100	KX420439.1	<i>Aedes aegypti</i>
117	100	BOLD:AAA4210	100	AF380835.2	<i>Aedes aegypti</i>
132	100	BOLD:AAA4210	100	KX420439.1	<i>Aedes aegypti</i>
133	100	BOLD:AAA4210	100	KX420439.1	<i>Aedes aegypti</i>
370	100	BOLD:AAA4210	100	KX420439.1	<i>Aedes aegypti</i>
157	99,81	BOLD:AAA4210	99	KM457525.1	<i>Aedes aegypti</i>
165	100	BOLD:AAA4210	99	KM457525.1	<i>Aedes aegypti</i>
392	99,75	BOLD:AAA4210	99	KX420476.1	<i>Aedes aegypti</i>
394	100	BOLD:AAA4210	100	KX420439.1	<i>Aedes aegypti</i>
451	100	BOLD:AAA4210	100	KX420439.1	<i>Aedes aegypti</i>
454	100	BOLD:AAA4210	100	KX420439.1	<i>Aedes aegypti</i>
455	100	BOLD:AAA4210	100	KX420439.1	<i>Aedes aegypti</i>
465	100	BOLD:AAA4210	100	KX420439.1	<i>Aedes aegypti</i>
487	100	BOLD:AAA4210	100	KX420439.1	<i>Aedes aegypti</i>
19	99,84	BOLD:AAA4210	99	KX420476.1	<i>Aedes aegypti</i>
100	100	BOLD:AAA4210	100	KX420439.1	<i>Aedes aegypti</i>
122	100	BOLD:AAA4210	100	KX420439.1	<i>Aedes aegypti</i>
124	100	BOLD:AAA4210	100	KX420439.1	<i>Aedes aegypti</i>
125	100	BOLD:AAA4210	100	KX420439.1	<i>Aedes aegypti</i>
142	100	BOLD:AAA4210	100	KX420476.1	<i>Aedes aegypti</i>

510	100	BOLD:AAA4210	99	KX420476.1	<i>Aedes aegypti</i>
509	100	BOLD:AAA4210	100	KX420439.1	<i>Aedes aegypti</i>
356	100	BOLD:AAA4210	100	KX420439.1	<i>Aedes aegypti</i>
357	100	BOLD:AAA4210	100	KX420439.1	<i>Aedes aegypti</i>
375	100	BOLD:AAA4210	100	KX420439.1	<i>Aedes aegypti</i>
376	100	BOLD:AAA4210	100	KX420439.1	<i>Aedes aegypti</i>
367	100	BOLD:AAA4210	100	KX420439.1	<i>Aedes aegypti</i>
372	100	BOLD:AAA4210	99	KX420439.1	<i>Aedes aegypti</i>
453	100	BOLD:AAA4210	100	KX420439.1	<i>Aedes aegypti</i>
105	100	BOLD:AAA4210	100	KX420439.1	<i>Aedes aegypti</i>

Anexo 2: Tabla de haplotipos del gen COI *Aedes aegypti*. Frecuencia y secuencias que constituyen cada haplotipo. S=Sasaima, Y=Yopal

HAPLOTIPOS	SECUENCIAS	FRECUENCIA	POBLACIÓN
1	402S	1	Sasaima
2	100S 101Y 103Y 104Y 105Y 107Y 113Y 115Y 117Y 122Y 124Y 125Y 132Y 133Y 356Y 357Y 367Y 370Y 375Y 376Y 382S 384S 394S 398S 400S 401S 403S 451Y 453Y 454Y 455Y 465Y 487S 509S	34	Sasaima - Yopal
3	102Y	1	Yopal
4	399S	1	Sasaima
5	406S	1	Sasaima
6	157S	1	Sasaima
7	165S	1	Sasaima
8	392S	1	Sasaima
9	19S	1	Sasaima
10	142S	1	Sasaima
11	510S	1	Sasaima
12	372Y	1	Yopal

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Shi Q-M, et al. (2017) The genetic diversity and population structure of domestic *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Yunnan Province, southwestern China. *Parasit Vectors* 10. doi:10.1186/s13071-017-2213-6.
2. Alves de Sousa A, Fraga E, Sampaio I, Schneider H, Barros MC (2017) Genetic differentiation in populations of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) dengue vector from the Brazilian state of Maranhão. *Revista Brasileira de Entomologia* 61(1):51–59.
3. Caldera SM, Jaramillo MC, Cochero S, Pérez-Doria A, Bejarano EE (2012) Diferencias genéticas entre poblaciones de *Aedes aegypti* de municipios del norte de Colombia, con baja y alta incidencia de dengue. *Biomédica* 33(0). doi:10.7705/biomedica. v33i0.1573.
4. Salud OP de la, Bureau PAS (1995) *Dengue y Dengue Hemorrágico en Las Américas: Guías para Su Prevención y Control* (Organización Panamericana de la Salud, Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud).
5. Ruiz-López F, et al. (2016) Presencia de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) y su infección natural con el virus del dengue en alturas no registradas para Colombia. *Biomédica* 36(2):303–308.
6. Ballesteros Z, Daniela M (2015) Estudio piloto de la variación genética del mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en Ecuador, vector principal del virus del dengue y del virus del chikungunya. Available at: <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/5651> [Accessed January 6, 2019].
7. Cabezas L, et al. (2017) Spatial distribution of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the rural area of two municipalities of Cundinamarca, Colombia. *Biomédica* 37:41–49.
8. Padilla JC, Rojas DP, Saenz-Gomez R (2012) *Dengue en Colombia: Epidemiología de la reemergencia a la hiperendemia*. Primera.
9. Velandia-Romero ML, et al. (2017) Dengue virus detection in *Aedes aegypti* larvae and pupae collected in rural areas of Anapoima, Cundinamarca, Colombia. *Biomédica* 37:193–200.
10. Murillo Torres EM (2016) Variabilidad genética de poblaciones de *Aedes aegypti* en El Salvador. diploma (Facultad de Ciencias Naturales y Matemática). Available at: <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/11720/> [Accessed January 6, 2019].
11. Bhatt S, et al. (2013) The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496(7446):504–507.
12. OMS. Organización Mundial de la Salud Dengue y dengue grave. *Dengue y Dengue hemorrágico*. Available at: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue> [Accessed August 16, 2018].

13. Jaimes-Dueñez J, Arboleda S, Triana-Chávez O, Gómez-Palacio A (2015) Spatio-Temporal Distribution of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Mitochondrial Lineages in Cities with Distinct Dengue Incidence Rates Suggests Complex Population Dynamics of the Dengue Vector in Colombia. *PLoS Negl Trop Dis* 9(4). doi:10.1371/journal.pntd.0003553.
14. Urdaneta-Marquez L, Failloux A-B (2011) Population genetic structure of *Aedes aegypti*, the principal vector of dengue viruses. *Infection, Genetics and Evolution* 11(2):253–261.
15. Bracco JE, Capurro ML, Lourenço-de-Oliveira R, Sallum MAM (2007) Genetic variability of *Aedes aegypti* in the Americas using a mitochondrial gene: evidence of multiple introductions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102(5):573–580.
16. INS. Instituto Nacional de Salud (2018) Boletín epidemiológico semanal. *Semana epidemiológica 28 de 2018*. Available at: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue> [Accessed August 16, 2018].
17. Hiragi C, et al. (2009) Genetic Variability in *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) Populations Using RAPD Markers. *Neotropical Entomology* 38(4):542–547.
18. Cadavid JM, Rúa G, Campo O, Bedoya G, Rojas W (2015) Cambios genéticos temporales y microgeográficos de *Aedes aegypti* en Medellín, Colombia. *Biomédica* 35(1):53–61.
19. Twerdochlib AL, et al. (2012) Genetic variability of a population of *Aedes aegypti* from Paraná, Brazil, using the mitochondrial ND4 gene. *Revista Brasileira de Entomologia* 56(2):249–256.
20. Julio NB, et al. (2009) Genetic structure of *Aedes aegypti* in the city of Córdoba (Argentina), a recently reinfested area. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104(4):626–631.
21. Leiva G. N, Cáceres R. O (2004) Variabilidad genética de *Aedes aegypti* en algunas áreas del Perú usando Single Stranded Conformational Polymorphism (SSCP). *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 21(3). doi:10.17843/rpmesp.2004.213.952.
22. Crawford AJ, Paz A, Gonzalez M (2011) Códigos de barras de la vida: introducción y perspectiva. *Acta Biológica Colombiana* 16(3):161–176.
23. Gobernación de Casanare Municipio de Yopal. *Casanare*. Available at: <https://www.casanare.gov.co/index.php?idcategoria=1271> [Accessed August 16, 2018].
24. Alcaldía de Sasaima Nuestro Municipio. *Sasaima-Cundinamarca*. Available at: http://www.sasaima-cundinamarca.gov.co/informacion_general.shtml [Accessed September 5, 2018].

25. Forattini OP (1973) *Entomologia médica* ([Univ. de São Paulo] Faculdade de Higiene e Saúde Pública, Departamento de Parasitologia).
26. Walter Reed Biosystematics Unit (2018) Identification keys to medically important arthropod species. Available at: <http://www.wrbu.org/> [Accessed January 6, 2019].
27. Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Marine Biol Biotechnol* 3(5):294–299.
28. Ruiz F, et al. (2010) Molecular comparison of topotypic specimens confirms *Anopheles (Nyssorhynchus) dunhami* Causey (Diptera: Culicidae) in the Colombian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105(7):899–903.
29. Green MR, Sambrook J (2016) Precipitation of DNA with Ethanol. *Cold Spring Harb Protoc* 2016(12):pdb.prot093377.
30. Hall T (1999) *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT* (Ibis Therapeutics) Available at: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>.
31. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol* 35(6):1547–1549.
32. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215(3):403–410.
33. Ratnasingham S, Hebert PDN (2007) BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Mol Ecol Notes* 7(3):355–364.
34. Rozas J, et al. (2017) DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Mol Biol Evol* 34(12):3299–3302.
35. Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16(1):37–48.
36. Puillandre N, Lambert A, Brouillet S, Achaz G (2012) ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Mol Ecol* 21(8):1864–1877.
37. Atencia MC, Pérez M de J, Caldera SM, Jaramillo MC, Bejarano EE (2018) Variabilidad genética de *Aedes aegypti* en el departamento de Sucre, Colombia, mediante el análisis de la secuencia de nucleótidos del gen mitocondrial ND4. *Biomédica* 38(2):267–276.
38. Paupy C, et al. (2012) Genetic structure and phylogeography of *Aedes aegypti*, the dengue and yellow-fever mosquito vector in Bolivia. *Infection, Genetics and Evolution* 12(6):1260–1269.

39. Yáñez P, et al. (2013) Variabilidad genética del *Aedes aegypti* determinada mediante el análisis del gen mitocondrial Nd4 en once áreas endémicas para dengue en el Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica* 30(2):246–250.
40. dos Santos Paduan K, Ribolla P (2008) Mitochondrial DNA Polymorphism and Heteroplasmy in Populations of *Aedes aegypti* in Brazil. *Journal of medical entomology* 45:59–67.
41. Scarpassa VM, Cardoza TB, Cardoso Junior RP (2008) Population genetics and phylogeography of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 78(6):895–903.
42. Ardila-Roldán S, Santacoloma L, Brochero H (2013) Estado de la sensibilidad a los insecticidas de uso en salud pública en poblaciones naturales de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) del departamento de Casanare, Colombia. *Biomédica* 33(3):446–58.
43. Huber K, et al. (2002) Genetic differentiation of the dengue vector, *Aedes aegypti* (Ho Chi Minh City, Vietnam) using microsatellite markers. *Mol Ecol* 11(9):1629–1635.